UNTERSUCHUNGEN ZUM AUFBAU EINES RADIOLIGANDEN-REZEPTORASSAYS FÜR TSH UND SCHILDDRÜSENSTIMULIERENDE IMMUNGLOBULINE

Anette Wille

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535726_0049

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR DR. E. BUCHBORN

UNTERSUCHUNGEN ZUM AUFBAU EINES RADIOLIGANDEN-REZEPTORASSAYS FÜR TSH UND SCHILDDRÜSENSTIMULIERENDE IMMUNGLOBULINE

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt
von
Anette Wille
aus
München

1980

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Frau Prof. Dr. C. R. Pickardt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meinen Eltern

Mein besonderer Dank gilt
Herrn Professor Dr. med. P. C. Scriba
für die Überlassung des Themas dieser Arbeit,
Frau Professor Dr. med. C. R. Pickardt
für die Förderung und Betreuung,
Herrn Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Fr. Erhardt
für seine Ratschläge und seine Unterstützung,
Fräulein R. Rothenfußer und Fräulein C. Schuster
im Namen aller Angestellten für die angenehme
Zusammenarbeit,
Frau F. Haag und Frau I. Wiktorin
für die Hilfe beim Anfertigen der Abbildungen.

ABKÜRZUNGEN

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BSA	Rinderalbumin (bovine serum albumin)
b-	bovin
g	Erdbeschleunigung
IpM	Impulse pro Minute
HCG	Humanes Choriongonadotropin
h-	human
LATS	long-acting thyroid stimulator
LH	luteinisierendes Hormon
M	molar
N	unspezifische Bindung
RIA	Radioimmunoassay
RRA	Radioliganden-Rezeptorassay
TSH	schilddrüsenstimulierendes Hormon
TSI	schilddrüsenstimulierendes Immunglobulin

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Bedeutung der schilddrüsenstimulierenden Immunglobuline (TSI)	1
1.2.	Erklärung des Begriffs "TSI"	1
1.3.	Nachweis der TSI mit dem Radioliganden-Rezeptorassay (RRA)	3
1.4.	Zur Geschichte des RRA	3
1.5.	Problemstellung	4
2.	METHODEN UND ERGEBNISSE	5
2.1.	Membranpräparation	5
2.1.1.	Material, Reagenzien und Lösungen	5
2.1.2.	Theoretische Grundlagen	6
2.1.3.	Durchführung	6
2.1.4.	Einfluß der Homogenisierungszeit	9
2.2.	Markierung mit ^{125}Jod	11
2.2.1.	Charakteristik des Isotops	11
2.2.2.	Reagenzien und Geräte	12
2.2.3.	Jodierung nach GREENWOOD und HUNTER (14)	13
2.2.3.1.	Durchführung	13
2.2.3.2.	Berechnung der spezifischen Aktivität	15
2.2.4.	Jodierung nach GOLDFINE (13)	16
2.2.5.	Membranreinigung	17
2.2.5.1.	Reagenzien und Geräte	17
2.2.5.2.	Durchführung	17

		Seite
2.2.6.	Bindungstest	20
2.3.	Vorversuche	23
2.3.1.	pH-Abhängigkeit	23
2.3.2.	Abhängigkeit der Tracerbindung von Temperatur und Inkubationszeit	25
2.3.3.	Zentrifugen	25
2.3.4.	Dichtegradientenzentrifugation	27
2.3.4.1.	Herstellung des Gradienten	27
2.3.4.2.	Nephelometrie	27
2.3.4.3.	Proteinbestimmung nach LOWRY	29
2.3.4.4.	Bindungstest	29
2.3.5.	Filtrationsversuche	32
2.4.	Standardkurven	34
2.4.1.	Vorversuche	34
2.4.1.1.	h-TSH: RIA-Standard (MRC 68/38)	34
2.4.1.2.	h-TSH: Gewonnen aus Hypophysen-homogenisaten	34
2.4.1.2.1.	Präparation der Hypophysen	34
2.4.1.2.2.	TSH-Bestimmung im RIA	35
2.4.1.2.3.	TSH-Bestimmung im RRA	35
2.4.1.3.	b-TSH	37
2.4.1.4.	TSI-haltige Seren	37
2.4.1.4.1.	Abtrennung der Gammaglobulinfraktion TSI-haltiger Seren	39
2.4.1.4.2.	Bestimmung des Proteingehaltes	43
2.4.1.4.3.	Eichkurven	43
2.4.2.	Aufstellung eines Normalkollektivs	46
2.4.2.1.	Auswahl der Seren	46
2.4.2.2.	Ergebnisse	46

		Seite
2.4.3.	Messung von pathologischen Seren	46
2.4.3.1.	Auswahl der Seren	46
2.4.3.2.	Ergebnisse	46
3.	DISKUSSION	48
4.	ZUSAMMENFASSUNG	56
5.	LITERATUR	58

1. EINLEITUNG

1.1. Bedeutung der schilddrüsenstimulierenden Immunglobuline (TSI)

Nach dem heutigen Stand der Forschung ist für die Entstehung des Morbus Basedow eine Störung des Immunsystems verantwortlich. In 50 bis 70 % der Seren von unbehandelten Patienten mit einer Hyperthyreose vom Typ des Morbus Basedow lassen sich entweder mit dem Mäuse-Bioassay nach McKENZIE (29, 36) oder mit dem Radioliganden-Rezeptorassay (20, 25, 51) schilddrüsenstimulierende Antikörper nachweisen. SCHLEUSENER (43, 44) berichtet, daß die TSI-Aktivität der Schilddrüse bei einem Teil der Patienten mit Morbus Basedow während und nach der Therapie mit thyreostatischen Substanzen oder Radiojod oder nach Operation abfällt.

1.2. Erklärung des Begriffs "TSI"

Unter den Bezeichnungen "Thyroid stimulating immunoglobulins" (TSI) und "Thyroid stimulating antibodies (TSAb) (1) werden schilddrüsenstimulierende Antikörper zusammengefaßt. Bekannt sind heute:

- Long-acting thyroid stimulator = LATS (16), der die Wirkungen von TSH auf die Schilddrüse imitiert. Diese setzen jedoch später ein und halten länger an. LATS gehört den IgG-Immunglobulinen an (21).

- LATS-Protector = LATS-P (2, 3), ebenfalls ein IgG, das sich im Blut von Basedow-Patienten findet. Es stimuliert Mäuseschilddrüsen primär nicht und ist deshalb im McKenzie-

. Bioassay nicht nachweisbar. Erst nach Adsorption mit humanem Schilddrüsenextrakt kommt in diesen Seren die LATS-Wirkung auf Mäuseschilddrüsen zum Tragen.

- Human thyroid adenyl cyclase stimulator = HTACS (7, 39): Dieser Antikörper kann in menschlichen Schilddrüsenpräparaten anhand der Aktivierung der Adenylzyklase durch Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat nachgewiesen werden.

- Human thyroid stimulator (HTS) (38, 47) wird ebenfalls durch c-AMP-Produktion in menschlichen Schilddrüsenschnitten nachgewiesen.

McKENZIE et al. und andere Autoren (2, 4, 30, 48) stellten die Hypothese auf, daß es sich bei diesen Immunglobulinen um polyklonale Autoantikörper handelt, die gegen antigene Strukturen der menschlichen Schilddrüsenzelloberfläche gerichtet sind, die aber verschiedene Kreuzreaktionen mit Schilddrüsenzellstrukturen anderer Spezies, z. B. Maus oder Meerschweinchen, zeigen.

Auch SCHLEUSENER (44) führt die unterschiedlichen Reaktionen von LATS und LATS-P auf Varianten der Antikörper gegen e i n Antigen in der menschlichen Schilddrüse zurück. Von SMITH et al. (49, 52) wurde nachgewiesen, daß die TSI-Aktivität des IgG-Immunglobulins durch Kombination von schweren und leichten Ketten im Fab-Fragment des Moleküls entsteht.

Auf die Schilddrüse wirken TSH und TSI in ähnlicher Weise. Beide stimulieren über die Adenylzyklase durch Bildung von

Cyclo-AMP die Schilddrüsenzellen (15, 19, 25). SMITH et al. (52) schließlich vermuten, daß TSH und TSI am gleichen Rezeptormolekül angreifen.

1.3. Nachweis der TSI mit dem Radioliganden-Rezeptorassay (RRA)

Eine Möglichkeit, schilddrüsenstimulierende Antikörper nachzuweisen, bietet der Radioliganden-Rezeptorassay (RRA). Er folgt dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsanalyse: Aus der Verdrängung von radioaktiv markiertem Hormon vom Rezeptor kann anhand einer Eichkurve auf die eingesetzte unbekannte Hormonmenge geschlossen werden.

1.4. Zur Geschichte des RRA

1968 wurde von KORENMAN (18) erstmals ein Hormonnachweis unter Verwendung von Zellrezeptoren (für Östradiol) beschrieben. In den folgenden Jahren wurden Radioliganden-Rezeptornachweismethoden für ACTH (LEFKOWITZ et al., 1970; 22), LH/HCG (CATT et al., 1971; 9, 10) und TSH (SMITH und HALL, 1974; 51, und MANLEY et al., 1974; 25) entwickelt. Gegenüber dem Radioimmunoassay bietet der RRA den Vorteil, daß nicht die immunologische Aktivität einer Substanz gegen einen Antikörper, sondern ihre Bindungsfähigkeit an den endogenen Rezeptor gezeigt wird. Allerdings werden mit diesen Versuchsansätzen keine biologischen Wirkungen von Hormonen bzw. endogenen Autoantikörpern nachgewiesen.

1.5. Problemstellung

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Radioliganden-Rezeptor-assay (RRA) für schilddrüsenstimulierende Immunglobuline entwickelt werden, der z. B. eine Kontrolle der Therapie des Morbus Basedow ermöglicht.

2. METHODEN UND ERGEBNISSE

2.1. Membranpräparation

2.1.1. Material, Reagenzien und Lösungen

- Homogenisierungspuffer: 10 mM NaH_2PO_4
  140 mM NaCl
  10 mM $MgCl_2$
  1 mM $NaHCO_3$

  Einstellen des pH auf 6,5 mit 1 N NaOH.

- Puffer A: 10 mM NaH_2PO_4
  50 mM NaCl

  Einstellen des pH auf 6,5 mit 1 N NaOH.

- 2 M NaCl
- Homogenisator: Waring Commercial Blendor
- Kühlzentrifuge (Fa. Beckman Instr.)
- Ultrazentrifuge (Model L 50 Fa. Beckman Instr.)
- Rotor 35 (Fa. Beckman Instr.)
- Polycarbonatröhrchen, Vol. 70 ml (Fa. Beckman Instr.)

Für die Proteinbestimmung nach LOWRY (24):

Lösung D: 49,0 ml $NaCO_3$, 2 % in 0,1 M NaOH
0,5 ml $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, 0,5 %
0,5 ml K-Na-Tartrat-Lösung, 5 %
2,5 ml SDS (Na-Dodecylsulfat)

- Folinreagens, Verdünnung 1 : 2

Die Präparate zur Herstellung von Puffern und Lösungen stammen von der Firma Merck, Darmstadt.

2.1.2. Theoretische Grundlagen

Von AMIR et al. (5) wurde nachgewiesen, daß die TSH-Rezeptoren der Schilddrüse in den Zellmembranen lokalisiert sind. Eine Anreicherung der Rezeptoren kann durch Präparation von Schilddrüsenzellkulturen (23, 58, 59) oder mit gelösten Rezeptoren (40, 53, 55) oder durch Membranpräparation von Schilddrüsen-Operationspräparaten (25, 35, 44, 51) erfolgen.

WOLFF und JONES (60) gelang es, durch fraktionierte Ultrazentrifugation aus Operationspräparaten hochgereinigte Plasmamembranen zu erhalten. NAUMAN et al. (35) isolierten die Plasmamembranen durch diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation.

Um ein möglichst einfaches Verfahren für den Nachweis von TSI zu entwickeln, wird hier eine grobe Membranpräparation, wie sie SCHLEUSENER (24) verwendet, nämlich das 800 - 8000 g-Sediment aus der Ultrazentrifugation, den hochgereinigten Plasmamembranen vorgezogen.

2.1.3. Durchführung

Als Ausgangsmaterial dienen Operationspräparate von Strumaresektionen *) (euthyreote und hyperthyreote Strumen).

---

*) Ich danke Herrn Dr. A. Stanischeff, Chirurgische Privatklinik Bogenhausen, München, für die Bereitstellung der Präparate.

Das bei -80°C aufbewahrte Schilddrüsenmaterial wird mit einem Skalpell in millimeterdünne Scheibchen geschnitten und in Portionen von 10 bis 15 g unter Zugabe von 50 ml Homogenisierungspuffer (siehe 2.1.1.) im Waring Commercial Blendor bei 5.000 UpM homogenisiert. Das Homogenisat wird bei 4°C 10 Minuten lang mit 800 g zentrifugiert. Der trübe Überstand, als Fraktion 1 (F 1) bezeichnet, wird über eine vierfache Mullbinde gefiltert und anschließend in der Ultrazentrifuge 20 Minuten lang mit ca. 8.000 g zentrifugiert. Das 800 g-Sediment wird erneut homogenisiert und wie das geschnittene Schilddrüsenmaterial weiterbehandelt. Diese Präparation wird als Fraktion 2 (F 2) bezeichnet.

Nach der Ultrazentrifugation wird der Überstand verworfen und der Niederschlag in 50 ml Puffer A aufgenommen und erneut 20 Minuten mit 8.000 g zentrifugiert. Der Waschvorgang wird zweimal wiederholt, bis der Überstand wasserklar ist. In einem Präparationsansatz, der jeweils im Kühlraum bei 4°C durchgeführt wird, lassen sich ca. 90 g Schilddrüse (Frischgewicht) verarbeiten. Nach dem letzten Waschen wird der Rückstand in Puffer A aufgenommen und so verdünnt, daß ein Milliliter 3 g Schilddrüsenäquivalent (Frischgewicht) enthält. Diese Suspension wird fraktioniert und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C eingefroren.

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt nach der Methode von LOWRY et al. (24), die um den Faktor 10^2 empfindlicher ist als die Biuretreaktion. Als Standard dient hochgereinigtes Rinderalbumin (Fa. Behring).

Die Eiweißbestimmung wird folgendermaßen durchgeführt: In Eppendorfgefäße (2 ml), die je 1 ml Lösung D (siehe 2.1.1.) enthalten, werden 50 µl Membransuspension bzw. Standardlösung pipettiert. Die Proben werden sofort geschüttelt und anschließend genau 10 Minuten stehengelassen. Darauf werden 0,1 ml Folinreagens unter Schütteln zugegeben. Der kräftige Gelbton der Lösung verschwindet während der 30-minütigen Inkubationszeit. Es kommt zu einer Blaufärbung, deren Intensität vom Proteingehalt der Probe abhängt, und die durch die Reduktion des Phosphomolybdatphosphowolframat-Reagens durch Cu-behandeltes Protein zustandekommt.

Die Extinktion der Proben wird in einem Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm bestimmt. Anhand der Eichkurve (siehe Abb. 1), die mit hochgereinigtem Rinderalbumin erstellt wird, läßt sich die Proteinkonzentration der Proben ermitteln.

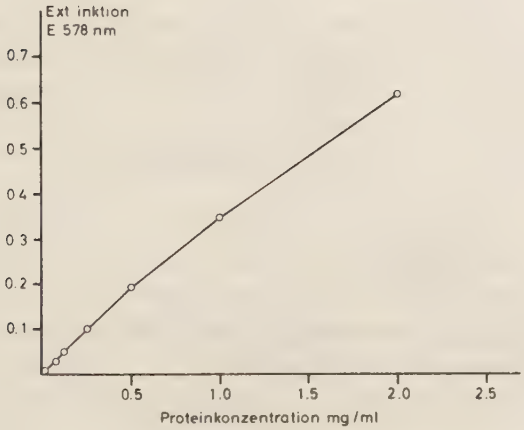

Abb. 1: Eichkurve zur Proteinbestimmung n. LOWRY
Standard: Rinderalbumin reinst (Fa. Behring)
Ordinate: Extinktion bei 578 nm
Abszisse: Proteinkonzentration in mg/ml

2.1.4. Einfluß der Homogenisierungszeit

Um die Abhängigkeit der Ausbeute an Membranprotein von der Zerkleinerung des Schilddrüsengewebes zu untersuchen, wird die Homogenisierungszeit in einem Bereich von 2 bis 60 Sekunden variiert. In Abb. 2 ist der Zusammenhang zwischen Homogenisierungszeit, Tracerbindung (siehe 2.2.) und eingesetzter Proteinmenge dargestellt.

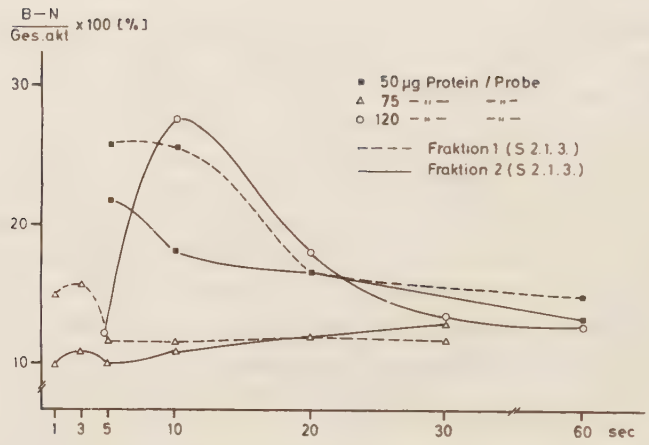

Abb. 2: Tracerbindung in Abhängigkeit von der Homogenisierungszeit

Ordinate: % ^{125}J-b-TSH-Tracerbindung

Abszisse: Homogenisierungszeit in Sekunden

Fraktion 1 entspricht dem Produkt aus der 1. Homogenisation

Fraktion 2 entspricht dem Produkt aus der 2. Homogenisation

Es ergibt sich eine deutlich höhere spezifische Bindung (siehe 2.2.6.) bei Homogenisierungszeiten von 3 bis 10 Sekunden. Die optimale Zeitspanne variiert von Schilddrüse zu Schilddrüse. Um bei einer unbekannten Schilddrüse ein möglichst gut bindendes Material zu gewinnen, werden F 1 und F 2 (siehe 2.1.3.) je 5 bis 7 Sekunden homogenisiert. Vor dem letzten Präparationsschritt werden die Rückstände von F 1 und F 2 vereinigt, um eine größere Menge homogenen

Materials für den Rezeptorassay zu erhalten. Ein Gramm Schilddrüse (Frischgewicht) ergibt im Mittel 2,2 mg Membranprotein.

2.2. Markierung mit ^{125}Jod

Da schilddrüsenstimulierende Immunglobuline aus dem Serum nicht isoliert werden können, muß thyreotropes Hormon als Referenzsubstanz (Standard) und als Tracer verwendet werden. Um eine radioaktive Tracersubstanz zu erhalten, wird das schilddrüsenstimulierende Hormon der Hypophyse vom Rind (b-TSH) mit dem Jodisotop ^{125}Jod markiert.

2.2.1. Charakteristik des Isotops

^{125}Jod zerfällt durch Elektroneneinfang unter Gammastrahlung in ^{125}Tellur. Die spezifische Aktivität des trägerfreien Isotops beträgt 57 Ci/pg, die Halbwertszeit 60 Tage. Die Verwendung von ^{125}Jod hat gegenüber der von ^{131}Jod den Vorteil, daß der Isotopengehalt handelsüblicher Präparate bei ^{125}Jod 80 bis 100 % des gesamten Jods beträgt, während er bei ^{131}Jod nur bei ca. 30 % liegt. Einen weiteren Vorteil bietet die längere Halbwertszeit, die bei ^{131}Jod nur 8,09 Tage beträgt.

2.2.2. Reagenzien und Geräte

- ^{125}Jod-Natriumjodid zur Eiweißmarkierung, spez. Akt. 57 Ci/pg (Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/Main)
- b-TSH, spez.Aktivität 30 E/mg (Geschenk von Dr. J. G. Pierce, Los Angeles, USA) in silikonisierten Glasröhrchen, aufbewahrt bei -30°C
- Chloramin T (Fa. Merck, Darmstadt)
- Natriumdisulfit (Fa. Merck, Darmstadt)
- Kaliumjodid (Fa. Merck, Darmstadt)
- Sephadex G-75 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
- Puffer A (siehe 2.1.1.)
- Daraus Puffer B und C
  durch Zugabe von 0,2 % bzw. 2 % BSA (zur Sättigung der Sephadex-Säule)
- Chloramin T-Lösung:
  25 mg auf 10 ml Puffer A (siehe 2.2.1.3.) bzw.
  1 mg auf 20 ml Puffer A (siehe 2.2.1.4.)
- Natriumdisulfit-Lösung:
  25 mg Natriumdisulfit auf 8 ml Puffer A
- Kaliumjodid-Lösung:
  100 mg KJ auf 10 ml Puffer A

Vorbereitung der Sephadex G-75-Säule:
- Sephadex G-75 in Puffer A einrühren und ca. 12 Stunden quellen lassen,
- Ausfluß eines Säulenglasrohrs (15 x 1 cm, selbstausgezogen) mit etwas Glaswatte abdichten,
- Glasrohr lotrecht befestigen und mit Puffer A vorspülen,
- gequollenes Gel bis zu einer endgültigen Höhe von 8 cm einfüllen und absetzen lassen,
- mit Puffer A nachwaschen,
- wenn die Oberfläche trocken ist, 1 ml Puffer C einziehen lassen, um die spezifischen Bindungsstellen des Sephadex-Gels abzusättigen, und mit 20 ml Puffer A nachwaschen.

2.2.3. Jodierung nach GREENWOOD und HUNTER (14)

2.2.3.1. Durchführung

In ein Spitzglas werden nacheinander pipettiert:
- 10 µl ^{125}Jod-Lösung (0,5 mCi) in 0,5 M Na-Phosphat pH 7,5
- 5 µl b-TSH-Lösung (2,5 µg)
- 10 µl Chloramin T-Lösung (25 µg)

Das Gemisch wird 5 Sekunden auf einem Vortex-Mischer geschüttelt. Zum Stoppen der Reaktion werden
- 50 µl Na-Disulfit (31 µg)

zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird mit einer Glaskapillarpipette restlos auf die Sephadex-Säule übertragen. Anschließend werden Reaktionsgefäß und Pipette mit 50 µl Kaliumjodid gespült, die ebenfalls auf die Säule übertragen werden. Eluiert wird mit Puffer A. Es werden 30 Fraktionen zu je 15 Tropfen in Eppendorfgefäßen gesammelt, die je 20 µl Puffer C enthalten, um die Adsorption des TSH an die Gefäße zu verhindern. Wird die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen, so ergibt sich folgendes Elutionsprofil (siehe Abb. 3):

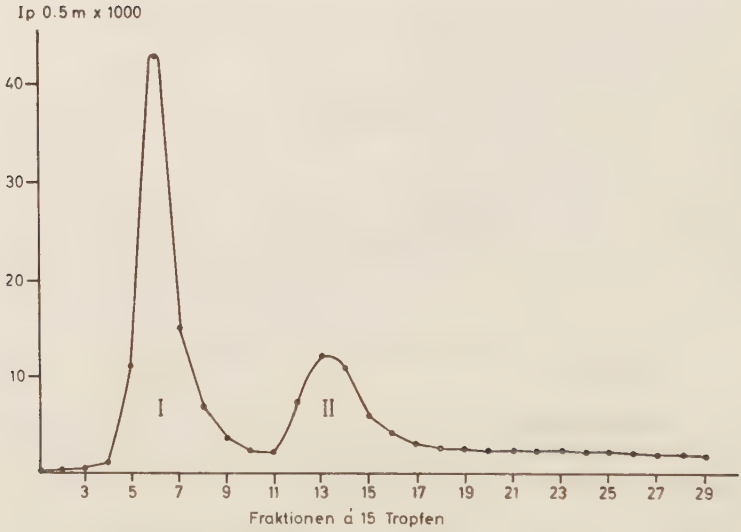

Abb. 3: Elutionsprofil der Markierung von b-TSH nach GREENWOOD und HUNTER (14)

Ordinate: Zählrate (Impulse pro 0,5 Minuten)

Abszisse: Fraktionen à 15 Tropfen

I Jodidpeak

II ^{125}Jod-TSH

2.2.3.2. Berechnung der spezifischen Aktivität

Im Unterschied zur Definition der spezifischen Aktivität der Isotopen versteht man in diesem Fall unter der spezifischen Aktivität die an das Hormonprotein gebundene Radioaktivität in Ci/g bzw. µCi/µg.

Um einen groben Überblick über die Aktivität des Tracers zu erhalten, addiert man die Zählraten pro Zeiteinheit für alle 30 Proben des Eluats und erhält somit die Gesamtaktivität. Anschließend addiert man die Fraktionen des Proteinpeaks und berechnet ihren Anteil in Prozent der Gesamtaktivität. Dabei wird die Restaktivität an Markierungsgefäß, Pipette und Sephadex-Säule vernachlässigt. Zur Erläuterung folgt die Berechnung der spezifischen Aktivität am Beispiel der Markierung von Abbildung 3:

- Summe der Zählraten F 1 - 30:	288.900 Ipm =	100 %
- Summe der Zählraten F 5 - 8:	152.720 Ipm =	58 %
- Gesamtaktivität des ^{125}Jod :		0,5 mCi
- eingesetzte b-TSH-Menge :		2,5 µg
- 58 % der Gesamtaktivität im b-TSH-Peak (Fraktion 5 - 8) :		0,28 mCi
spezifische Aktivität :		116,0 µCi/ µg

Bei 12 Markierungen ergaben sich spezifische Aktivitäten in einem Bereich von 49 bis 116 µCi/ µg b-TSH.

2.2.4. Jodierung nach GOLDFINE (13)

Da das starke Oxidationsmittel Chloramin T und das starke Reduktionsmittel Na-Disulfit eine eventuelle Schädigung der biologischen Aktivität des b-TSH bedingen, wird der Jodierung nach GREENWOOD und HUNTER eine Markierung nach der Methode von GOLDFINE gegenübergestellt, bei der das Chloramin T in stöchiometrischen Mengen eingesetzt wird.

Dieses Verfahren unterscheidet sich von dem in 2.2.3.1. beschriebenen folgendermaßen:

In das Markierungsgefäß werden pipettiert:
- 10 µl ^{125}Jod-Lösung (0,5 mCi)
- 5 µl b-TSH-Lösung (2,5 µg)
- 10 µl Chloramin T-Lösung (0,25 µg)

Man läßt die Oxidationsreaktion auslaufen, indem man das Gemisch 45 Minuten bei Raumtemperatur stehen läßt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch mit einer Glaskapillarpipette auf die Sephadex-Säule übertragen und Reaktionsgefäß und Pipette werden mit 50 µl Puffer A gespült. Dabei ergibt sich eine spezifische Aktivität von 57 bis 102 µCi/µg b-TSH. Ein Vergleich dieses Markierungsverfahrens mit dem nach GREENWOOD und HUNTER zeigt, daß die Tracerbindung im gleichen Bereich liegt.

2.2.5. Membranreinigung

2.2.5.1. Reagenzien und Geräte

- Schilddrüsenmembran-Präparation (siehe 2.1.) entsprechend 10 g Schilddrüse (Frischgewicht) in Polycarbonatröhrchen
- Ultrazentrifuge (Model L 50, Fa. Beckman Instruments)
- Titaniumrotor TI 50
- Polycarbonatröhrchen, Volumen 7 ml (Fa. Beckman Instruments)
- Sephadex G-50 fine-Säule, selbstausgezogen, Innendurchmesser 2,5 cm, Länge 80 cm, Gelhöhe 75 cm
- Sephadex G-50 fine (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden)

2.2.5.2. Durchführung

Im Anschluß an die Tracermarkierung kann durch eine Membranreinigung die maximale Bindungsfähigkeit des Tracers um das Zwei- bis Vierfache gesteigert werden (50). Die Spitzenfraktionen des Proteinpeaks werden zu einer Schilddrüsenpräparation gegeben, deren Menge ca. 10 Gramm Schilddrüsenfrischgewicht entspricht und 30 Minuten bei 30°C inkubiert, um das aktive ^{125}Jod-TSH zu binden. Das Inkubationsgemisch wird mit 5 ml Puffer B aufgefüllt und 10 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird wiederum in 5 ml Puffer B aufgenommen und erneut zetrifugiert. Dieser Waschvorgang wird dreimal wiederholt. Der Rückstand wird dann in 2 ml 2 M NaCl aufgenommen und 30 Minuten bei 4°C stehen gelassen, um das gebundene ^{125}Jod-TSH abzuspalten.

Nach der anschließenden Zentrifugation bei 100.000 g findet sich ca. die Hälfte der Aktivität im Überstand. Dieser wird im Verhältnis 1 : 2 mit Puffer A verdünnt und über eine 75 x 2,5 cm große Sephadex G-50 fine-Säule chromatographiert. Die Verdünnung ist nötig, um ein Verstopfen der Säule zu verhindern. Das Eluat wird in Fraktionen zu je 2,7 ml gesammelt. Die Messung der Radioaktivität ergibt folgendes Elutionsprofil (Abb. 4):

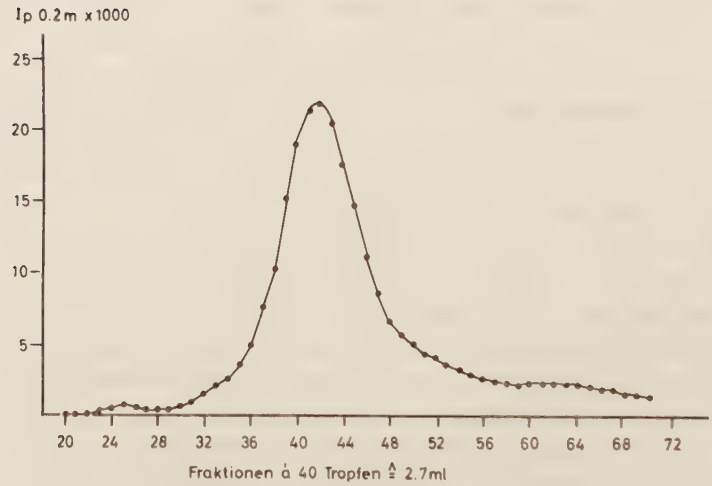

Abb. 4: Elutionsprofil nach Membranreinigung des b-TSH-Tracers
Ordinate: Impulse pro 0,2 Minuten
Abszisse: Fraktionen zu je 40 Tropfen = 2,7 ml

Um das Gelingen der Membranreinigung zu überprüfen, werden nach jeder Zentrifugation 20 µl aus dem Überstand entnommen und deren Radioaktivität im Gammazähler (Gamma-Guard, Fa. Tracerlab, Köln) gezählt:

Aliquots à 20 µl aus dem Überstand

(IpM)	
18.330	1) nach Inkubation mit der Membransuspension und Zentrifugation bei 20.000 g
4.450	2) nach dem 1. Waschvorgang
1.575	3) nach dem 2. Waschvorgang
960	4) nach dem 3. Waschvorgang
8.565	5) nach Inkubation mit 2 M NaCl und Zentrifugation bei 100.000 g

5) wird über die Säule chromatographiert.

Als Tracer werden die Spitzenfraktionen des Proteinpeaks vereinigt und auf ca. 5.000 IpM/100 µl verdünnt.

Mit dieser Markierung erhält man einen Tracer, der eine spezifische Bindung an Schilddrüsen-Plasmamembranen bis zu 60 % aufweist.
Bei 4°C aufbewahrt läßt sich der Tracer bis zu zwei Wochen verwenden; die biologische Aktivität nimmt in diesem Zeitraum allerdings um ca. 50 % ab. Den gleichen Aktivitätsverlust findet man, wenn das radioaktive TSH bei -20°C eingefroren und kurz vor der Verwendung im heißen Wasserbad aufgetaut wird.

2.2.6. Bindungstest

Nach jeder Markierung wird der Tracer in einem Bindungstest auf seine Qualität geprüft. Dabei werden unterschiedliche Membranmengen, z. B. 250 µg, 500 µg und 1000 µg Protein (bestimmt nach der Methode von LOWRY, 24) mit je 100 µl Tracer (= 5.000 IpM) inkubiert.

Die bei -80°C aufbewahrte Membransuspension wird schonend aufgetaut und mit einem handbetriebenen Glas-Teflon-Potter-Homogenisator drei- bis fünfmal zerrieben und - falls nötig - auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml verdünnt. Dann wird sie im Eisbad mit einem Magnetkern gerührt, um eine Sedimentation der Membranpartikel zu verhindern.

Wegen der raschen Sedimentation ist es nicht möglich, die Membranen mit der Hamiltonspritze zu pipettieren. Die Pipettierschritte werden im Eisbad durchgeführt. Zu 400 µl Puffer A mit 0,2 % BSA (entsprechend dem B_o-Wert im RRA, siehe 2.4.) werden mit der Hamiltonspritze 100 µl 7 %iger Albuminpuffer (Puffer A mit Zusatz von 7 % Albumin, pH 6,5) zugefügt, um im Ansatz eine Endkonzentration von ca. 1 % BSA zu erreichen. Dann wird - unter Rühren - die Membransuspension mit einer Eppendorfpipette zugegeben. Anschließend werden je 100 µl b-TSH-Tracer mit der Hamiltonspritze zugefügt, um eine ausreichende Mischung des Inkubationsansatzes zu erreichen.

Die Inkubation für 60 Minuten bei 37°C erfolgt in einem Schüttelbad, um die Sedimentation der Membranen zu verhindern.

Die Trennung von freiem und an die Membran gebundenem b-TSH wird mittels Zentrifugation durchgeführt. Dazu werden die Proben mit je 2 ml Puffer B (enthält 0,1 % Albumin, um eine Adsorption des TSH an die Röhrchen zu verhindern) aufgefüllt und 60 Minuten bei 4.000 g (Kühlzentrifuge Damon PR 6000) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und der Niederschlag mit 2 ml desselben Puffers gewaschen (Zentrifugation für 30 Minuten). Die Radioaktivität im Rückstand wird in einem Gammazähler (Gamma-Guard, Fa. Tracerlab, Köln) bestimmt. Die Zählzeit beträgt 5 Minuten, um bei niedriger Aktivität der Proben den statistischen Fehler möglichst gering zu halten.

Zur Feststellung der unspezifischen Bindung N werden Proben mit 500 mE b-TSH (Thyreostimulin^{R}, Fa. Organon) im Ansatz mitbestimmt. Die spezifische Bindung erhält man durch Subtraktion von N vom Zählergebnis für jeden einzelnen Meßpunkt.

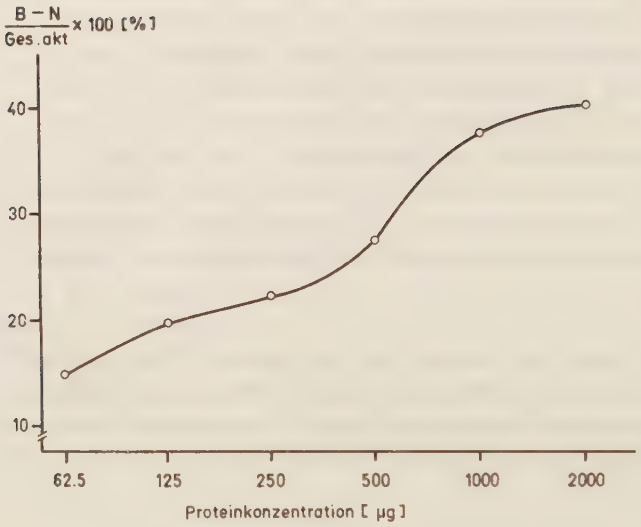

Abb. 5: Bindungstest der Membranqualität
Die Membranen stammen von e i n e r Schilddrüse, Bestimmung in Dreifachwerten.

Ordinate: Tracerbindung in % der Gesamtaktivität
Abszisse: Proteinkonzentration in µg

2.3. Vorversuche

Um eine möglichst hohe spezifische Bindung des Tracers an die Membranen zu erzielen, werden in mehreren Vorversuchen die Inkubationsbedingungen variiert, ausgehend von der Methode von SCHLEUSENER (45 und pers. Mitteilung).

2.3.1. pH-Abhängigkeit

Um den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die maximale Tracerbindung beurteilen zu können, bestimmt man B_o-Werte in einem pH-Bereich von 4 bis 9 (Abb. 6). Bei einem pH von 4 bis 5,5 kann Acetat-, bei pH 6 bis 7,5 Phosphat- und von pH 8 bis 9 Carbonatpuffer verwendet werden. Es zeigt sich, daß der günstigste Meßbereich bei pH-Werten von 5,5 bis 7,0 liegt. Um in den Ansätzen eine konstante Wasserstoffionenkonzentration zu erhalten (siehe 2.4.1.4.1.), werden die folgenden Versuche bei pH 6,5 durchgeführt.

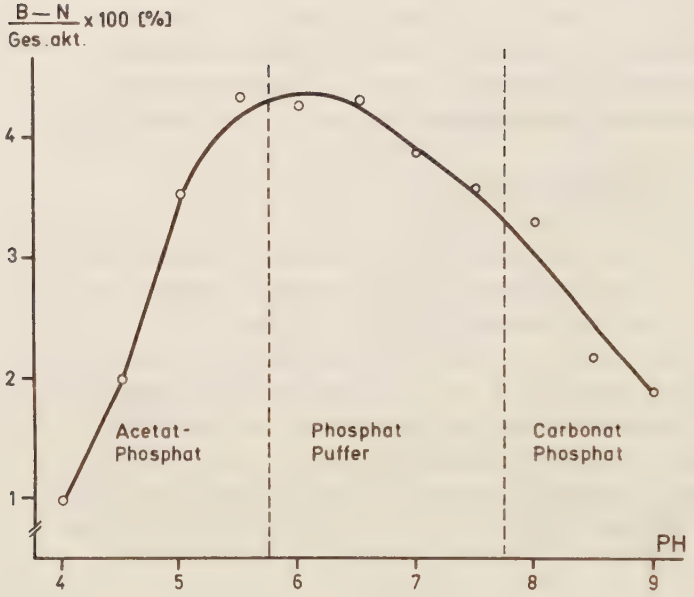

Abb. 6: pH-Abhängigkeit der Tracerbindung
Bound/Free-Trennung durch Zentrifugation bei 4000 g, Dreifachbestimmung.
Ordinate: Bindung in % der Gesamtaktivität
Abszisse: pH-Werte

2.3.2. Abhängigkeit der Tracerbindung von Temperatur und Inkubationszeit

Außer dem pH-Wert des Inkubationsgemisches wirken sich auch Inkubationszeit und -temperatur auf die maximale Tracerbindung aus. Um die günstigsten Bedingungen festzustellen, werden B_o-Werte bei 4°C und 37°C über verschieden lange Zeiträume inkubiert.

Wie aus Abb. 7 hervorgeht, steigt die maximale Bindung mit zunehmender Temperatur und Inkubationszeit. Bei 37°C erreicht sie bereits nach einer Stunde ein Maximum, während bei 4°C nach 180 Minuten noch kein Plateau erreicht ist.
Für den Radiorezeptorassay hat sich eine Inkubationszeit von 60 Minuten bei einer Inkubationstemperatur von 37°C als günstig erwiesen.

2.3.3. Zentrifugen

Daß die Zählausbeute auch von der g-Zahl bei der Zentrifugation zur Bound/Free-Trennung abhängt, zeigen Versuche mit verschiedenen Zentrifugen:

	mittlere g-Zahl	Ausbeute $\frac{B}{T}$ %
- Ultrazentrifuge (Beckman)	165.000	22,0
- Kühlzentrifuge (Damon)	4.000	19,5
- Eppendorf-Zentrifuge	3.000	12,5
- Kühlzentrifuge (Beckman)	2.600	11,0

Bei der Ultrazentrifugation ergibt sich zwar die höchste Zählausbeute, diese Methode hat jedoch praktische Nachteile: In einem Durchgang können nur maximal 12 Proben zentrifugiert werden und die verwendeten Polyäthylennitrat-Röhrchen sind teuer.
Deshalb findet bei den beschriebenen Radioliganden-Rezeptorassays die Damon PR 6000 Kühlzentrifuge Verwendung, bei der zwar nur 4000 UpM = 4000 g erreicht werden, sich aber in einem Ansatz 114 Proben zentrifugieren lassen.

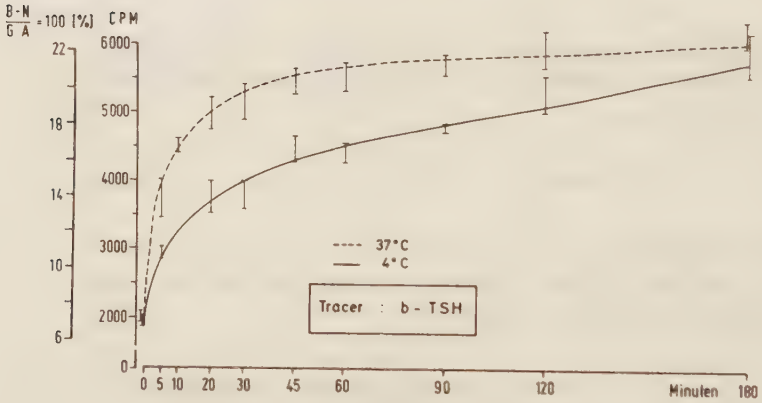

Abb. 7: Einfluß von Temperatur und Inkubationszeit auf die Tracerbindung
Abszisse: Zeit in Minuten
Ordinate: Bindung in % der Gesamtaktivität

2.3.4. Dichtegradientenzentrifugation

Wie von NAUMAN und WASILEWSKA (35) berichtet wird, lassen sich aus der groben Membranpräparation durch Dichtegradientenzentrifugation die TSH-Rezeptoren stark anreichern.

2.3.4.1. Herstellung des Gradienten

Mit einem Gradientenmischer wird ein kontinuierlicher Gradient mit Dichten von 1,1 bis 2,25 folgendermaßen hergestellt:

d = 1,10 24 % w/w = 36,0 g Saccharose auf 114,0 g Puffer A
d = 2,25 49 % w/w = 83,5 g Saccharose auf 66,5 g Puffer A

Zur Stabilisation wird der Gradient in der Ultrazentrifuge (Rotor SW 27) 60 Minuten bei 26.500 UpM zentrifugiert. Anschließend werden je 40 g-Äquivalent Schilddrüse aus der groben Membranpräparation (siehe 2.1.) auf den Gradienten gebracht.
Die Zentrifugation erfolgt bei 26.500 UpM für 3 bzw. 10 Stunden. Der Inhalt der Röhrchen wird mit Hilfe eines Fraktionssammlers in 35 Fraktionen aufgetrennt.

2.3.4.2. Nephelometrie

Ein Aliquot von 50 µl wird aus jeder Fraktion entnommen und verdünnt. Im Zeiss-Photometer wird bei einer Wellenlänge von 650 nm die Trübung bestimmt. In Kontrollröhrchen, die nur den Saccharosegradienten enthalten, werden mit dem Refraktometer die Zuckerkonzentrationen gemessen.

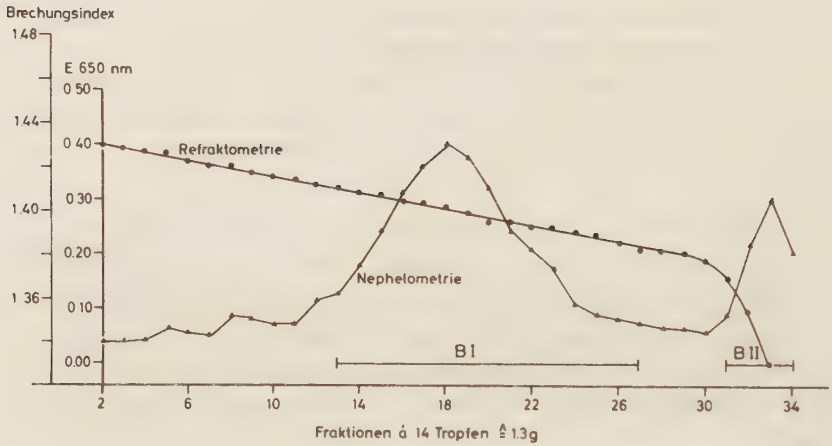

Abb. 8: Membranreinigung durch Dichtegradientenzentrifugation

Es lassen sich zwei Banden (B) mit stärkerer Trübung erkennen:

B 1 (Fraktion 13 - 28) und

B 2 (Fraktion 31 - 35).

Die entsprechenden Fraktionen werden zu B 1 und B 2 vereinigt.

2.3.4.3. Proteinbestimmung nach LOWRY

Anschließend wird der Proteingehalt von Bande 1, Bande 2 sowie von der Ausgangspräparation (GM = grobe Membranpräparation) bestimmt:

Bande 1	6,0 mg Protein/ml
Bande 2	0,8 mg Protein/ml
GM	3,4 mg Protein/ml

2.3.4.4. Bindungstest

Um bei dem Bindungstest vergleichbare Resultate zu erhalten, werden jeweils gleiche Proteinkonzentrationen von B 1 und GM pro Probe eingesetzt.

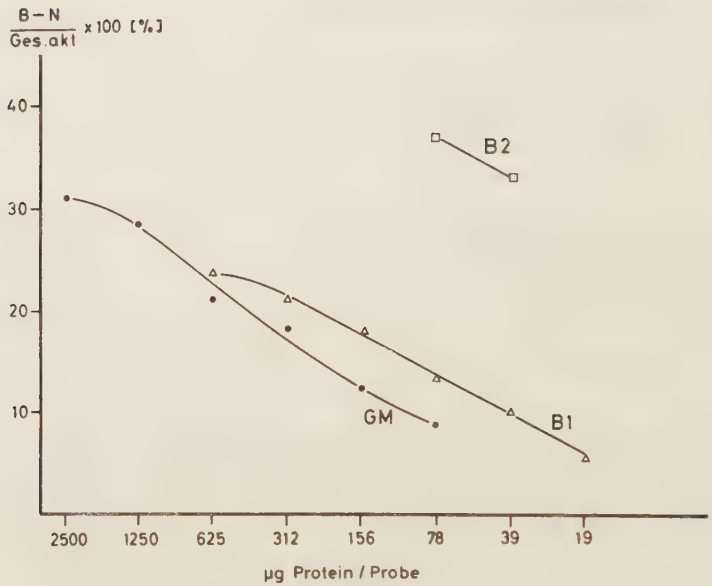

Abb. 9: Bindungstest mit gradientengereinigten Membranen

B 1 : Bande 1 bei der Nephelometrie (2.3.4.2.)

B 2 : Bande 2 bei der Nephelometrie

GM : Grobe Membranpräparation

Ordinate: Bindung in % der Gesamtaktivität

Abszisse: Proteinkonzentration pro Probe

Bei diesem Versuch finden sich die meisten Rezeptoren im Überstand, während Autoren, die einen diskontinuierlichen Gradienten verwenden (35, 56, 60), das am stärksten bindende Material bei einer Dichte von 1,16 bis 1,18 nachweisen.

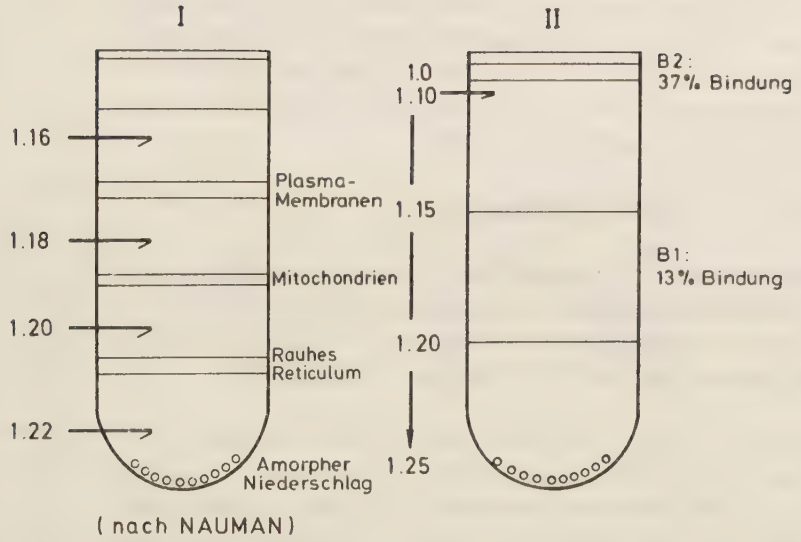

Abb. 10: Membranreinigung durch Dichtegradientenzentrifugation

I : Diskontinuierlicher Gradient (Ergebnis von NAUMAN, 35)

II : Kontinuierlicher Gradient (eigene Ergebnisse)

Bezeichnungen wie in Abb. 9

Die Methode der Membranreinigung durch Dichtegradientenzentrifugation wird nicht weiter verfolgt, da die Durchführung sehr aufwendig und die Ausbeute gering ist. Die hochgereinigten Rezeptoren weisen zwar eine höhere spezifische Bindung auf, die Empfindlichkeit des RRA läßt sich damit jedoch nicht steigern. Es hat sich gezeigt, daß für den Rezeptorassay die Bindungsfähigkeit der groben Membranpräparation ausreicht.

2.3.5. Filtrationsversuche

In dem Bestreben, ein möglichst einfaches Verfahren zur Bound/Free-Trennung zur Verfügung zu haben, werden die Möglichkeiten untersucht, die sich mit der Filtration ergeben. Diese wird von KOTANI et al. (19) benutzt.

Ein automatisiertes Verfahren für die B/F-Trennung und die anschließende Radioaktivitätsmessung steht mit einem modularen Analysensystem für Doppelantikörper-RIAs (28) zur Verfügung, bei dem die Bound/Free-Trennung über Nuclepore-Filter durchgeführt wird. Für die Pipettierschritte und die Inkubation werden Eppendorfgefäße verwendet. Die Mikrolitergefäße werden in Reaktionsketten eingereiht und diskontinuierlich über Nuclepore-Membranen filtriert, die von einem Vorspannfilm getragen werden. Die Filmauffangspule kann direkt in den Gamma-Zähler des Analysegerätes eingelegt werden.

Standardkurven mit Thyreostimulin^{R} (Organon), also b-TSH, zeigen (siehe Abb. 11), daß sich der Verlauf einer Kurve mit filtriertem Ansatz von dem einer Kurve mit zentrifugier-

tem Ansatz nicht wesentlich unterscheidet. Die Streuung bei der filtrierten Kurve ist jedoch größer. Deshalb wird beim Radioliganden-Rezeptorassay für die B/F-Trennung die Zentrifugation der Ansätze angewandt.

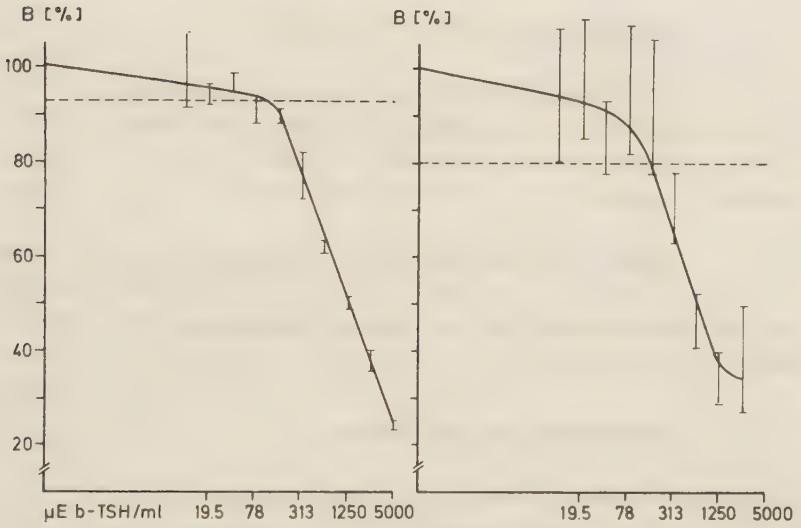

Abb. 11: Standardkurven mit b-TSH
links: B/F-Trennung durch Zentrifugation
rechts: B/F-Trennung durch Filtration
(Auswertung mit spline-approximation (27))
Ordinate: % Tracerbindung
Abszisse: Konzentration von b-TSH in µE/ml

2.4. Standardkurven

2.4.1. Vorversuche

Um einen geeigneten Standard für die Bestimmung der TSI zu erhalten, werden h-TSH, b-TSH und die Gammaglobulinfraktionen TSI-haltiger Seren (siehe 2.4.1.3.) auf ihre Verdrängungseigenschaften im Rezeptorassay untersucht.

2.4.1.1. h-TSH: RIA-Standard (MRC 68/38)

MRC 68/38 zeigt in unserem Assay nur geringe Verdrängung (untere Nachweisgrenze 2 mE TSH/ml) entsprechend einer geringen biologischen Aktivität und ist daher für den Rezeptorassay ungeeignet.

2.4.1.2. h-TSH: Gewonnen aus Hypophysenhomogenisaten

Es wird der h-TSH-Gehalt von 20 humanen Hypophysen in RRA und RIA verglichen.

2.4.1.2.1. Präparation der Hypophysen

Die Hypophysen werden 16 bis 72 Stunden postmortal entnommen und bis zur Verarbeitung bei -80^{o}C aufbewahrt. Da die Schilddrüsenrezeptoren spezifisch für TSH sind (25, 31, 52, 56), hielten wir eine Abtrennung der anderen Hypophysenhormone nicht für notwendig. Eine mögliche Interaktion mit Gonadotropinen wurde nicht untersucht. Die Hypophysen werden mit dem Skalpell zerkleinert und in je 20 ml Puffer A im Waring Commercial Blendor bei 8000 UpM

60 Sekunden lang homogenisiert. Die Suspension wird für 10 Minuten mit 4000 g zentrifugiert und über eine vierfache Mullbinde gefiltert.
Anschließend wird 30 Minuten bei 30.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird in Portionen zu 2 ml aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

2.4.1.2.2. TSH-Bestimmung im RIA

Der RIA wird nach ERHARDT (12) für jede Hypophyse in den Verdünnungen 1:100, 1:1000 und 1:10.000 durchgeführt. Dabei ergeben sich Werte von 1 bis 268 mE TSH/ml Hypophysensuspension (siehe Tabelle 1).

2.4.1.2.3. TSH-Bestimmung im RRA

Es ergeben sich Werte zwischen 15 und 236 mE TSH/ml (ohne Berücksichtigung eines einzelnen, extrem hohen Wertes). Bei 13 der 20 Hypophysen liegen die Ergebnisse des RRA über denen des RIA (Differenz von 1 bis 110 mE/ml) (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: TSH-Bestimmung in humanen Hypophysen mit Radioimmunoassay und Radioliganden-Rezeptorassay

N	RIA TSH mE/ml	RRA TSH mE/ml	TSH Differenz	Gewicht g	Obduktion Std.p.m.
1	268	236	- 32	0,81	48
2	196	768	572	0,36	16
3	148	176	28	0,40	68
4	97	56	- 41	0,39	18
5	84	194	110	0,30	18
6	75	62	- 13	0,62	18
7	73	101	28	0,40	18
8	66	92	26	0,49	20
9	54	78	- 24	0,83	24
10	53	97	44	0,59	7
11	52	53	1	0,84	24
12	45	44	- 1	0,55	72
13	30	23	- 7	0,32	18
14	27	65	38	0,40	68
15	23	54	31	0,28	16
16	13	21	8	0,31	72
17	11	19	8	0,50	24
18	9	39	30	0,39	24
19	6	15	9	0,25	16
20	1	22	21	0,22	16

2.4.1.3. b-TSH

Mit b-TSH (Thyreostimulin^{R}, Organon, 5 E/ml, Angabe des Herstellers) erhält man brauchbare Eichkurven. Die untere Nachweisgrenze ($\bar{x}_{B}$ - 3s) schwankt jedoch bei gleichen Versuchsbedingungen zwischen 20 µE und 1250 µE b-TSH/Probe, was sowohl auf die unterschiedliche Aktivität der einzelnen Chargen des Thyreostimulins als auch auf das unterschiedliche Schilddrüsenmaterial zu beziehen ist. Die wechselnde Empfindlichkeit der Eichkurven läßt eine Standardisierung der TSI-Bestimmung mit b-TSH als Referenzsubstanz unmöglich erscheinen.

2.4.1.4. TSI-haltige Seren

Mit der Gammaglobulinfraktion eines individuellen TSI-haltigen Serums (siehe 2.4.1.4.1.) werden Verdünnungskurven angelegt. Da sie gut reproduzierbar sind, werden Meßwerte in normalen und TSI-verdächtigen Seren darauf bezogen. Den Vergleich von einem TSI-haltigen Serum, b-TSH und h-TSH zeigt Abb. 12.

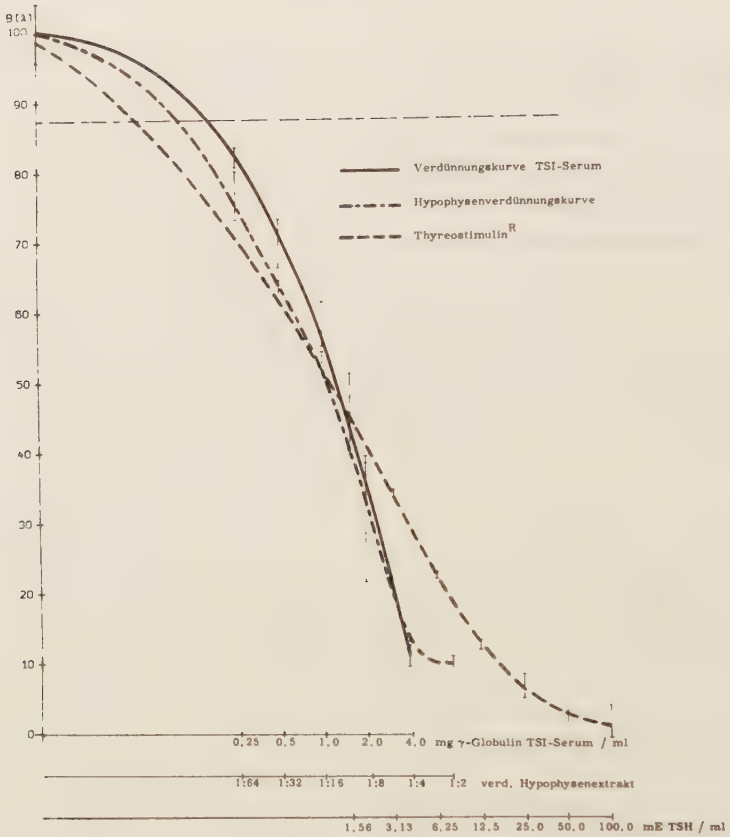

Abb. 12: Vergleich verschiedener Verdünnungskurven im RRA
Ordinate: % Tracerbindung
Abszisse: Konzentration von TSI-Serum, Hypophysenextrakt und b-TSH

2.4.1.4.1. Abtrennung der Gammaglobulinfraktion TSI-haltiger Seren

Da, wie einige Autoren (8, 20, 51) berichten, alle Serumglobuline die spezifische Bindung von TSH an die Membranen beeinflussen, wird versucht, die Gammaglobuline abzutrennen.

Statt der Fällung mit Ammoniumsulfat mit anschließender Dialyse (8, 20, 51) kommt eine Methode zur Anwendung, bei der die Gammaglobulinfraktion aus dem Serum über den starken basischen Anionenaustauscher QAE-Sephadex A-50 (Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden) abgetrennt wird.
2 ml 1:2 verdünntes Serum, pH 6,5, werden über 5 · 1 cm große QAE-Sephadex A-50-Säulen chromatographiert.

Säulenpräparation:
Man läßt die Dextran-Gel-Trockensubstanz QAE-Sephadex A-50 circa 12 Stunden in 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,5, quellen und füllt sie wie folgt in 5 ml-Einmalspritzen (Firma Braun, Melsungen): Vor den Auslauf der Spritzen werden feinporige Membranfilter (Fa. Sartorius, Göttingen) gelegt und diese Säulen mit der entsprechenden Menge Dextrangel-Puffer-Suspension bei verschlossenem Auslauf gefüllt. Nach Sedimentation des Gels werden die Säulen mit dem obengenannten Puffer gespült. Anschließend werden mit einer 25-Kanal-Peristaltikpumpe (Fa. Ismatec, Zürich) je 2 ml Serum angesaugt.

Pro Minute wird eine Fraktion (ca. 0,6 ml) gesammelt. Nach 20 Minuten wird die Säule mit 0,5 M NaCl ausgewaschen. Bei

der photometrischen Bestimmung (E = 280 nm) des Proteingehalts in den einzelnen Fraktionen lassen sich zwei Peaks erkennen (Abb. 13).

Durch Mitchromatographie von markiertem h-TSH und anschließende Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen (Abb. 14) wird nachgewiesen, daß das TSH in der zweiten Fraktion eluiert wird.

Die Elektrophorese zeigt eine starke Anreicherung der Gammaglobuline im ersten Peak, während die restlichen Globuline und das Albumin nahezu verschwunden sind. Dagegen lassen sich bei der Elektrophorese des zweiten Peak keine Gammaglobuline mehr erkennen (Abb. 15).

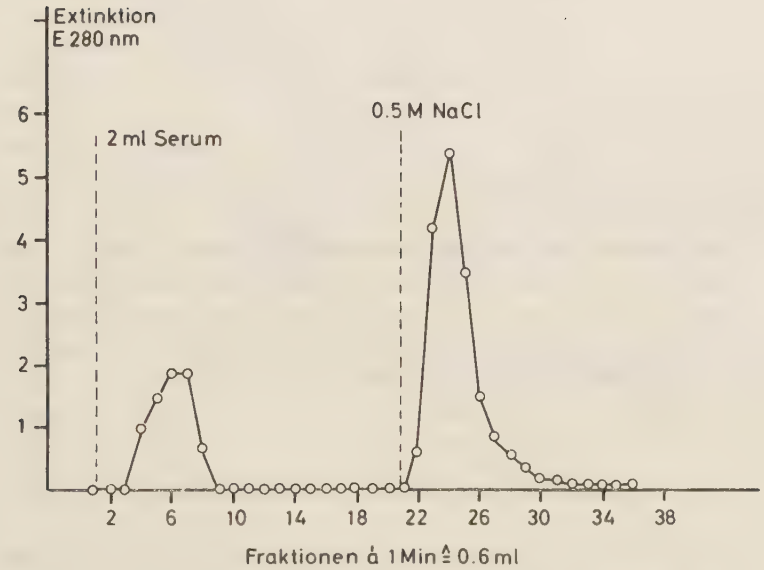

Abb. 13: Auftrennung des Serums über QAE-Sephadex A-50

I : 1. Peak

II : 2. Peak

Ordinate: Extinktion bei 280 nm

Abszisse: Fraktionen à 1 Minute = 0,6 ml

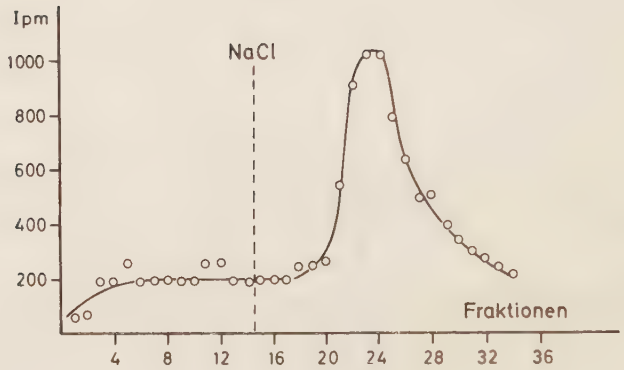

Abb. 14: Mitchromatographie von markiertem h-TSH
Ordinate: Impulse pro Minute
Abszisse: Fraktionen

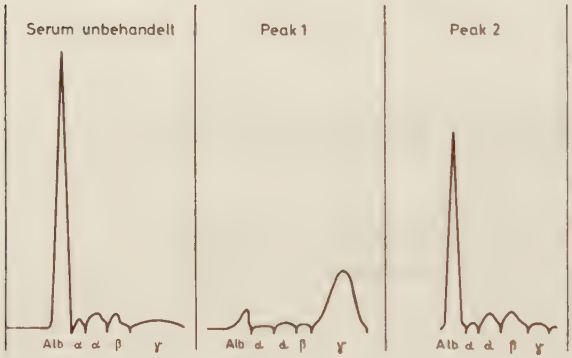

Abb. 15: Elektrophorese der über QAE-Sephadex A-50 aufgetrennten Serumfraktionen

2.4.1.4.2. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinkonzentration in den Eluaten wird anhand der Biuretreaktion (Merckotest^{R}, Fa. Merck) bestimmt. Aus praktischen Erwägungen werden in den RRA Konzentrationen von 2 mg Protein/ml eingesetzt, denn die Proteinkonzentration der meisten Eluate liegt etwas über diesem Wert. Dazu werden alle Gammaglobulin-Fraktionen mit 0,5 M Na-Phosphat-Puffer auf 2 mg Protein/ml verdünnt. Liegt die Ausgangskonzentration unter 2 mg/ml, so werden die Proben in Kollodiumhülsen gegen 50 mM Phosphatpuffer mittels Wasserstrahlpumpe eingeengt. Dann wird erneut der Proteingehalt bestimmt und die Proben werden gegebenenfalls wieder auf 2 mg Protein/ml verdünnt. Die so präparierten Serumfraktionen werden bis zu ihrer Verwendung bei -20^{o}C eingefroren.

2.4.1.4.3. Eichkurven

Nachdem sich in Vorversuchen gezeigt hat, daß das Serum der Basedow-Patientin P. (als P-Serum bezeichnet) das markierte TSH sehr stark aus seiner Bindung an den Rezeptor verdrängt, werden damit mehrere Eichkurven angelegt nach dem folgenden Schema, das auch bei allen weiteren RRA-Ansätzen verwendet wird:

Ansatz	N (ml)	B_o (ml)	S (ml)
P-Serum-Verdünnung	-	-	0,4
Thyreostimulin^R 1 E/ml	0,4	-	-
Puffer A 7 % BSA	0,1	0,1	0,1
Membransuspension 5 mgProtein/ml	0,1	0,1	0,1
b-TSH-Tracer 5000 cpm/0,1 ml	0,1	0,1	0,1
Puffer A 0,2 % BSA	-	0,4	-
Gesamtvolumen	0,7	0,7	0,7

Erklärung: N = unspezifische Bindung
B_o = Leerwert
S = Standardkurve

Inkubationszeit 60 Minuten

Bound/Free-Trennung durch Zentrifugation

Die Bestimmungen werden in Dreifachwerten durchgeführt.

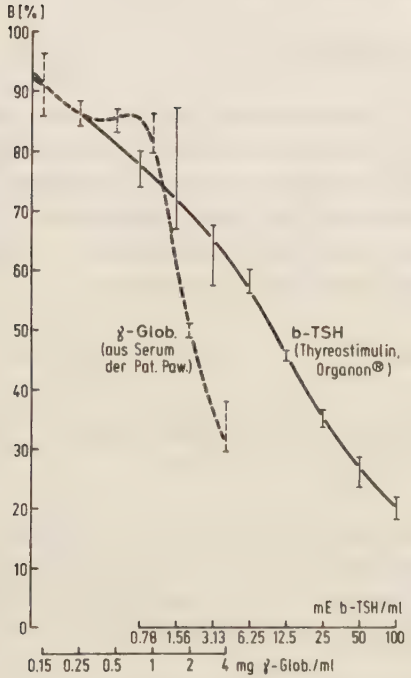

Abb. 16: Eichkurven mit b-TSH (Thyreostimulin^{R}) und P-Serum

2.4.2. Aufstellung eines Normalkollektivs

2.4.2.1. Auswahl der Seren

Zur Erstellung eines Normalkollektivs werden die Seren von 46 klinisch gesunden Personen verwendet. Die Gammaglobulinfraktion wird, wie unter 2.4.1.4.1. beschrieben, aus dem Serum abgetrennt und anschließend auf eine Proteinkonzentration von 2 mg Protein/ml gebracht und in den Radioliganden-Rezeptorassay eingesetzt.

2.4.2.2. Ergebnisse

$$\text{TSI-Index: } \frac{^{125}\text{J-TSH, geb. in TSI-haltigem Serum}}{^{125}\text{J-TSH, geb. in normalem Serum}} \times 100$$

Als Normalserum wird ein Gemisch aus zehn vorgetesteten Seren verwendet, die im RRA ^{125}Jod-TSH nicht verdrängen. Die Abbildung 17 zeigt die Verteilung des Normalkollektivs, angegeben als TSI-Index nach SMITH und HALL (51).

2.4.3. Messung von pathologischen Seren

2.4.3.1. Auswahl der Seren

Es werden 28 Seren von Patienten, die an Morbus Basedow, endokriner Ophthalmopathie oder Hyperthyreose anderer Genese erkrankt sind, auf ihren TSI-Gehalt untersucht.

2.4.3.2. Ergebnisse

Die Ergebnisse des RRA für die pathologischen Seren sind in Abb. 17 dargestellt (siehe auch Diskussion).

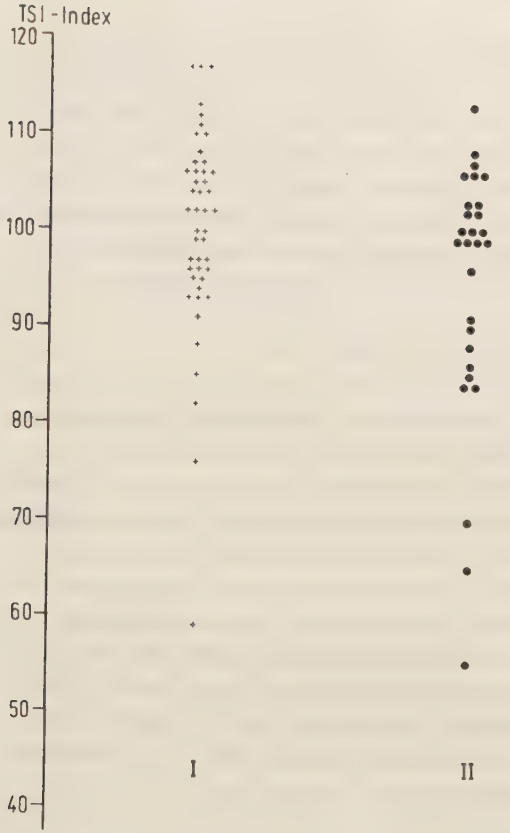

Abb. 17: Bestimmung der TSI-Aktivität mit dem RRA

I : TSI-Index von 46 klinisch gesunden Personen

II : TSI-Index von Patienten mit M.Basedow, endokriner Ophthalmopathie oder Hyperthyreose anderer Genese

3. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines möglichst einfach durchführbaren Radioliganden-Rezeptorassay (RRA) für schilddrüsenstimulierende Immunglobuline (TSI), der in der Klinik als Spezialuntersuchung zur Therapiekontrolle bei der Behandlung des Morbus Basedow eingesetzt werden kann.

Membranpräparation

Untersuchungen über die Struktur des Rezeptors sind von verschiedenen Autoren durchgeführt worden. TATE et al. (54) gelang es, durch Behandlung mit Trypsin aus Schilddrüsenmembranen eine Komponente mit einem Molekulargewicht von 15.000 - 30.000, die TSH spezifisch bindet, abzuspalten. Bei seinen Versuchen erhielt er einen nicht linearen Scatchard-Plot (42), was auf unterschiedliche Rezeptorpopulationen für TSH schließen läßt. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch andere Forscher (6, 19, 33), während in verschiedenen Instituten (5, 8, 26, 50, 56) aus einem linearen Scatchard-Plot auf nur eine Rezeptorpopulation geschlossen wird.

Auf die unterschiedliche Behandlung und Herkunft der Schilddrüsengewebe sind offensichtlich auch die Differenzen bezüglich des optimalen Versuchsansatzes zurückzuführen.

Aufgrund des unterschiedlichen Schilddrüsenmaterials aus den Operationspräparaten und der Instabilität des biologischen Materials, das bei den im Zuge dieser Arbeit durch-

geführten Versuchen zur Verfügung stand, war es nicht möglich, bei jeder Präparation Membranen von vergleichbarer Qualität, d. h. Bindungsfähigkeit, zu gewinnen.

Da die Reinigung des Tracers ebenfalls an Schilddrüsenmembranen erfolgt (siehe 2.2.5.), hängt auch die biologische Aktivität des gewonnenen TSH-Tracers von der Qualität des Schilddrüsenmaterials ab. Da die biologischen Bestandteile des RRA altern, d. h. die Bindung im Verlauf von Tagen beim Tracer und im Verlauf von Wochen bei der Membransuspension stark abnimmt, ergeben sich Schwierigkeiten bei dem Vergleich der verschiedenen Assays.

Bei der Wahl der Methode zur Präparation muß ein Kompromiß zwischen Reinheit der Membranen und einfacher Durchführbarkeit des Verfahrens gefunden werden. So läßt sich durch die aufwendige Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.3.4.) zwar die spezifische Bindung, nicht aber die Empfindlichkeit des Assay steigern (25, 35). Zudem ist die Ausbeute, bezogen auf das Frischgewicht der Schilddrüse, verschwindend gering. Auch die fraktionierte Ultrazentrifugation zur Membranpräparation von MOORE und WOLFF (33) ergibt zwar hochgereinigtes Material, ist aber für die klinische Anwendung zu aufwendig.

Markierung

Bei der unter 2.2.1. beschriebenen Markierung des b-TSH wurde ^{125}Jod verwendet. Als gleichwertig haben sich die Anwendung der Methode nach GREENWOOD und HUNTER (14) und die Markierung nach GOLDFINE (13), beide mit Chloramin T, gezeigt (siehe 2.2.4.).

Um das nicht mehr bindungsfähige, biologisch inaktive TSH abzutrennen und damit die Qualität des Tracers zu verbessern, wird eine Membranreinigung nach SMITH et al. durchgeführt (siehe 2.2.5.)
Dazu werden die Fraktionen mit der höchsten Aktivität aus der ^{125}J-TSH-Markierung mit Schilddrüsenmembranen inkubiert; das nicht mehr bindungsfähige TSH wird abzentrifugiert. Das intakte TSH wird mit 2 M NaCl von den Membranen abgespalten. Um schließlich TSH-Aggregate und noch vorhandenes Jodid abzutrennen, wird nochmals über eine Sephadex-Säule chromatographiert. So erhält man Tracer mit einer spezifischen Bindung bis zu 60 %, während ungereinigtes ^{125}J-TSH eine Bindung von nur ca. 10 % zeigt.

Variationen der Versuchsbedingungen

In der Literatur finden sich Differenzen bezüglich der günstigsten Versuchsbedingungen. Dies ist auf verschiedene Ausgangsmaterialien (Schilddrüsenmembranen von Mensch, Rind, Meerschweinchen usw.) und die unterschiedliche Art der Präparation zurückzuführen. So werden die pH-Werte im Ansatz bei 5,3 (8), 6,0 (13), 7,4 (37) und 7,5 (17) angegeben.

Die unter 2.3.1. beschriebenen Versuche ergeben bei einer Zentrifugation mit 4000 g einen günstigen pH-Bereich von 5,5 bis 7,0.

Die bei den Versuchen verwendeten RRA-Ansätze sind bei 4000 g zentrifugiert und haben einen pH-Wert von 6,5.

Eine andere Möglichkeit der Bound/Free-Trennung bietet die Filtration (siehe 2.3.5.). Diese Methode wird z.B. von AMIR et al. (5) angewendet, dagegen bezeichnen VERRIER et al. (56) die Filtration als nicht geeignet, da es zu einer Adsorption des markierten Hormons an die Filter kommt. Versuche dazu zeigen zwar gleichen Verlauf der Standardkurven nach Zentrifugation und Filtration, die Streuung der Werte bei der Filtration ist jedoch so hoch, daß im Gegensatz zur Zentrifugation nicht zuverlässig und reproduzierbar gemessen werden kann.

Auch über die optimale Inkubationszeit und -temperatur besteht Uneinigkeit bei den verschiedenen Forschergruppen: AMIR et al. (5) fanden, daß das TSH sofort und umgekehrt proportional zur Temperatur an die Membranen bindet. TATE et al. (17) stellten fest, daß die maximale Bindung bei 37°C sofort eintritt und nur kurzzeitig bestehen bleibt, während sie bei 0°C erst nach 30 Minuten erreicht wird und über längere Zeit stabil ist. Andere Autoren (17, 25, 31) fanden eine positive Korrelation von Temperatur und Inkubationszeit. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigen die höchste Bindung bei 37°C und eine positive Korrelation von Inkubationszeit und Bindung (siehe 2.3.2.).

Standardkurven

SMITH und HALL (51) geben die Ergebnisse ihres RRA als

$$\text{TSI-Index: } \frac{^{125}\text{J-TSH, geb. in TSI-haltigem Serum}}{^{125}\text{J-TSH, geb. in normalem Serum}} \times 100 \text{ an,}$$

da auch die Gammaglobulinfraktion von "gesunden" Patienten TSH-verdrängende Aktivität zeigt.
MEHDI et al. (32) stellen den Verdrängungseffekt des TSI als "TSH displacement activity" TDA dar:

$$\text{TDA} : 100 - \frac{\text{binding in sample tube}}{\text{control binding}} \times 100$$

Versuche unter Verwendung des Serums der Patientin P., das eine starke Verdrängung aufweist und mit dem sich reproduzierbare Ergebnisse erzielen lassen, sollen die Frage klären, ob, analog dem Verfahren im RIA, eine Eichkurve erstellt werden kann, an der sich eine pathologische Verdrängung des ^{125}J-TSH durch TSI ablesen läßt. Es zeigt sich jedoch, daß die Verdünnungskurven mit dem Gammaglobulin aus dem P-Serum und solche mit b-TSH und anderen verdrängenden Seren sich in ihrer Steilheit unterscheiden (Abb.13). Die Bedingung für die Brauchbarkeit eines Assay, nämlich Parallelität von Standardeichkurve und Verdünnungskurven, ist damit nicht gegeben. Deshalb werden die Ergebnisse des RRA als TSI-Index nach SMITH und HALL (51) (siehe 2.4.3.2.) dargestellt. Werte unter 80 können als pathologisch angesehen werden.

Abtrennung der Gammaglobulinfraktion

Die herkömmliche Methode zur Abtrennung der Gammaglobulinfraktion aus dem Serum mit Ammoniumsulfat (8, 20, 51) erfordert eine Dialyse von über 48 Stunden. Dieses zeitaufwendige Verfahren ist vermeidbar, wenn die Gammaglobuline aus dem Serum über einen stark basischen Anionenaustauscher (QAE-Sephadex A-50) abgetrennt werden. In einem Arbeitsgang lassen sich damit 25 verschiedene Seren behandeln. Die Elektrophorese weist die Wirksamkeit der Abtrennung nach. Daß das Serum-TSH von der Gammaglobulinfraktion getrennt werden kann, zeigt die Mitchromatographie von radioaktiv markiertem h-TSH.

Vergleich von RRA und RIA bei der Bestimmung des TSH von humanen Hypophysen

Im Homogenisat von 20 menschlichen Hypophysen wird jeweils das TSH in RRA und RIA bestimmt (siehe 2.4.1.2.). Die Ergebnisse liegen in vergleichbaren Bereichen. Auffällig ist, daß in 75 % der Bestimmungen die Werte des RRA über denen des RIA liegen (1 bis 110 mE/ml h-TSH).

Einschätzung der Brauchbarkeit des RRA

Wenn MUKHTAR et al. (34) 1975 noch bei allen von ihnen überprüften Patienten mit unbehandeltem Morbus Basedow TSI im Serum feststellen konnten, so wurden diese Ergebnisse in letzter Zeit revidiert. 1977 berichtet die gleiche Arbeitsgruppe (11) von einer TSI-Nachweisrate von 70 % bei unbehandelten Patienten. Die Diskrepanz der Ergebnisse

wird damit erklärt, daß in die ersten Versuchsreihen nur Patienten mit ausgeprägter Hyperthyreose aufgenommen wurden.

SCHLEUSENER et al. (46) konnten bei 56 % ihrer Patienten mit Morbus Basedow TSI im Serum nachweisen.

Literatur	Zahl der Patienten	positive Resultate
MUKHTAR et al. (34) 1975	56	56
DAVIES et al. (11) 1977	30	22
SCHLEUSENER (43) 1978	187	106

Danach läßt sich bei den vor Behandlungsbeginn TSI-positiven Patienten in der Mehrzahl der Fälle aus dem TSI-Index auf den Behandlungserfolg schließen.

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zeigen bei nur drei von 28 Patienten deutlich positive Ergebnisse im TSI-RRA. Das liegt unter anderem daran, daß die Seren von bereits behandelten Patienten stammten, die teils an Morbus Basedow, teils an schwerer Hyperthyreose anderer Genese erkrankt sind.

Da es bisher keiner Gruppe gelang, bei allen unbehandelten Patienten mit Morbus Basedow TSI im Serum nachzuweisen, stellt sich die Frage, ob bei den TSI-negativen Patienten keine Antikörper vorhanden sind, oder ihre Konzentration im Serum so gering ist, daß sie mit den bisher entwickelten Radioliganden-Rezeptorassays nicht erfaßt werden können.

Außerdem gibt es Anhaltspunkte dafür, daß auch zelluläre Immunprozesse eine Rolle in der Genese des Morbus Basedow spielen. VOLPÉ und Mitarbeiter (57) untersuchten den Makrophagen-Wanderungshemmfaktor (MIF) und fanden eine MIF-Sekretion durch Basedow-Lymphozyten nach Inkubation mit Schilddrüsenhomogenisaten. RAPOPORT et al. (41) beschrieben einen lymphocytic thyroid stimulator (LTS), der möglicherweise aus einer Kombination von Prostaglandin E und F besteht, und der zur Entstehung des Morbus Basedow beiträgt.

Wenn auch die Ätiologie des Morbus Basedow noch nicht ganz geklärt ist, so bietet doch der RRA die Möglichkeit, in einem Teil der Fälle eine Prognose für den Verlauf der Erkrankung zu stellen. Auch lassen die Ergebnisse anderer Forschergruppen (11, 43) eine Weiterarbeit am Radioliganden-Rezeptorassay für TSI sinnvoll erscheinen.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Aufbau eines Radioliganden-Rezeptorassay (RRA) für TSH und schilddrüsenstimulierende Immunglobuline (TSI).
Als Tracer dient ^{125}Jod-TSH, das durch Inkubation mit einer Schilddrüsenmembransuspension und anschließende Abspaltung des biologisch aktiven ^{125}J-TSH gereinigt wird.

^{125}J-TSH wird von Membranpräparationen aus humanen Schilddrüsen gebunden. Aus der Verdrängung des radioaktiven Hormons aus der Bindung kann anhand einer Eichkurve auf die unbekannte Menge an TSH oder TSI geschlossen werden.
Das Membranmaterial wird durch Homogenisierung und Zentrifugation von menschlichen Schilddrüsen-Operationspräparaten gewonnen. Dabei wird das 800 - 8000 g-Sediment verwendet.
Die spezifische Bindung des TSH an die Membranen ist von Wasserstoffionenkonzentration, Temperatur und Inkubationszeit abhängig. Als günstige Versuchsbedingungen wurden ein pH-Wert von 6,5, eine Inkubationstemperatur von 37°C und eine Inkubationszeit von 60 Minuten gefunden. Die Bound/Free-Trennung erfolgt durch Zentrifugation bei 4000 g.

Da alle Globuline eine unspezifische Bindung an die Membranen aufweisen, ist es notwendig, für den Nachweis von TSI die Gammaglobulinfraktion aus dem Serum zu gewinnen. Die Abtrennung erfolgt über QAE-Sephadex A-50-Säulen.

Die Verdrängungseigenschaften der Gammaglobulinfraktionen werden im RRA bestimmt. Anhand des TSI-Index nach SMITH

und HALL erfolgt die Einteilung in normale und pathologische Befunde.

Die niedrige Nachweisrate von TSI in den untersuchten Seren wird darauf zurückgeführt, daß das untersuchte Patientenkollektiv zur Zeit der Blutentnahme bereits behandelt war.
Mit dem RRA wird der TSH-Gehalt von Homogenisaten aus humanen, postmortal entnommenen Hypophysen bestimmt und mit den TSH-Werten aus dem RIA verglichen. Dabei ergibt sich eine positive Korrelation, wobei die TSH-Werte im RRA über denen des Radioimmunoassay liegen.

5. LITERATUR

1. ADAMS, D. D., R. HALL, P. KENDALL-TAYLOR, S. Q. MEHDI, B. R. SMITH
Nomenclature of thyroid stimulating antibodies
Lancet 1, 201 (1975)

2. ADAMS, D. D., T. H. KENNEDY
Occurence in thyrotoxicosis of a gamma globulin which protects LATS from neutralization by an extract of thyroid gland
J. Clin. Endocrinol. Metab. 27, 173 (1967)

3. ADAMS, D. D., T. H. KENNEDY
Evidence to suggest that LATS protector stimulates the human thyroid gland
J. Clin. Endocrinol. Metab. 33, 47 (1971)

4. ADAMS, D. D., T. H. KENNEDY, R. D. STEWART
Correlation between long-acting thyroid stimulator protector level and thyroid ^{131}J-uptake in thyrotoxicosis
Br. Med. J. 2, 199 (1974)

5. AMIR, S. M., T. F. CARRAWAY, L. D. KOHN
The binding of thyrotropin to isolated bovine thyroid plasma membranes
J. Biol. Chem 248, 4092 (1973)

6. AZUKIZAWA, M., G. KURTZMAN, A. E. PEKARY, J. M. HERSHMAN
Comparison of the binding characteristics of bovine thyrotropin and human chorionic gonadotropin to thyroid membranes
Endocrinology 101, 1880 (1977)

7. BECH, K., S. N. MADSEN
Human thyroid adenylate cyclase in non-toxic goitre: sensitivity to TSH, fluoride and thyroid stimulating immunoglobulin
Clin. Endocrinol. 8, 457 (1978)

8. BRYSON, J. M., A. JOASOO, J. R. TURTEE
The thyrotropin receptor in human thyroid plasma membranes: effect of serum immunoglobulins
Acta Endocrinol. 83, 528 (1976)

9. CATT, K. J., M. L. DUFAU, T. TSURUHARA
Studies on a radioligand-receptor assay system for luteinizing hormone and chorionic gonadotropin
J. Clin. Endocrinol. Metab. 32, 860 (1971)

10. CATT, K. J., L. DUFAU, T. TSURUHARA
Radioligand receptor assay of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 123 (1972)

11. DAVIES, T. F., D. C. EVERED, B. R. SMITH, P. P. YEO, F. CLARK, R. HALL
Value of thyroid stimulating antibody determination in predicting short-term relapse in Graves' disease
Lancet 1, 1181 (1977)

12. ERHARDT, F., I. MARSCHNER, C. R. PICKARDT, P. C. SCRIBA
Verbesserung der Qualitätskontrolle der radioimmunologischen Thyreotropinbestimmung
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 9, 50 (1973)

13. GOLDFINE, J. D., S. M. AMIR, A. W. PETERSEN, S. H. INGBAR
Preparation of biologically active ^{125}J-TSH
Endocrinology 95, 1228 (1974)

14. GREENWOOD, F. C., W. M. HUNTER, J. GLOVER
The preparation of ^{131}J-labelled human growth hormone of high specific activity
Biochem. J. 89, 114 (1963)

15. KENDALL-TAYLOR, P.
Adenyl cyclase activity in the mouse thyroid
J. Endocr. 52, 533 (1972)

16. KENDALL-TAYLOR, P.
Effects on long-acting thyroid stimulator (LATS) and LATS protector on human thyroid adenyl cyclase activity
Br. Med. J. 3, 72 (1973)

17. KISHIHARA, M., Y. NAKAO, Y. BABA, S. OHGO, S. MATSUKURA, K. KUMA, H. IMURA
The use of proteolytic enzyme inhibitor (Trasylol) in RRA of TSH - its application to measuring TSI in thyroid disease
Acta endocrinol. 88, 65 (1978)

18. KORENMAN, S. G., L. E. PERRIN, I. P. McCALLUM
A radioligand binding assay for oestradiol measurement in human plasma
J. Clin. Endocrinol. Metab. 29, 879 (1969)

19. KOTANI, M., T. KARIYA, J. B. FIELD
Studies of thyroid-stimulating hormone binding to bovine thyroid plasma membranes
Metabolism 24, 959 (1975)

20. KOTULLA, P., E. AULBERT, H. MEINHOLD, F. ADLKOFER, K. W. WENZEL, H. SCHLEUSENER
Methodical approaches to measuring thyroid stimulating factors with a radioligand receptor assay. In: Biochemical basis of thyroid stimulation and thyroid hormone action. Hrsg.: A.v.z.Mühlen u. H.Schleusener, Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

21. KRISS, J. P., V. PLESHAKOV, J. R. CHIEN
Isolation and identification of the long acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroididsm and circumscribed pretibial myxedema
J. Clin. Endocrinol. Metab. 24, 1005 (1964)

22. LEFKOWITZ, R. J., J. ROTH, W. PRICER, J. PASTAN
ACTH-receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-^{125}J and its relation to adenyl cyclase
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 65, 745 (1970)

23. LISSITZKY, S., G. FAYET, B. VERRIER, G. HENNEN, P. JACQUET
Thyroid-stimulating hormone binding to cultured thyroid cells
FEBS lett. 29, 20 (1973)

24. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL
Protein measurement with the Folin phenol reagent
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

25. MANLEY, S. W., J. R. BOURKE, R. W. HAWKER
The thyrotropin receptor in guinea pig thyroid homogenate: general properties
J. Endocr. 61, 419 (1974)

26. MANLEY, S. W., J. R. BOURKE, R. W. HAWKER
The thyrotropin receptor in guinea pig thyroid homogenate: interaction with the long-acting thyroid stimulator
J. Endocr. 61, 437 (1974)

27. MARSCHNER, I., H. DOBRY, F. ERHARDT, T. LANDERSDORFER, B. POPP, L. RINGEL, P. C. SCRIBA
Berechnung radioimmunologischer Meßwerte mittels spline-Funktionen
Ärztl. Lab. 20, 184 (1974)

28. MARSCHNER, I., F. ERHARDT, J. HENNER, P. C. SCRIBA
A modular analyzer system for double antibody RIAs
Z. klin. Chem. klin. Biochem. 13, 481 (1975)

29. McKENZIE, J. M.
The bioassay of thyrotropin in serum
Endocrinology 63, 372 (1958)

30. McKENZIE, J. M., M. ZAKARIJA
A reconsideration of a thyroid-stimulating immunoglobulin as the cause of a hyperthyroidism in Graves' diesease
J. Clin. Endocrinol. Metab. 42, 778 (1976)

31. MEHDI, S. Q., S. S. NUSSEY
A radioligand receptor assay for the long-acting thyroid stimulator
Biochem. J. 145, 105 (1975)

32. MEHDI, S. Q., S. S. NUSSEY, R. D. SIMPSON, C. L. BASHFORD, S. J. HARRISON, G. K. RADDA
The influence of membrane lipids on thyrotropin-receptor interactions
In: Thyroid Research. Hrsg.: J. Robbins, L. E. Braverman, Excerpta Medica, Amsterdam (1976)

33. MOORE, W. V., J. WOLFF
Thyroid-stimulating hormone binding to beef thyroid membranes
J. Biol. Chem. 249, 6255 (1974)

34. MUKHTAR, E. D., B. R. SMITH, G. A. PYLE, R. HALL, P. VICE
Relation of thyroid-stimulating immunoglobulins to thyroid function and effects of surgery, radioiodine and antithyroid drugs
Lancet 1, 713 (1975)

35. NAUMAN, J., A. WASILEWSKA
Binding of TSH to purified human thyroid membranes. In: Biochemical basis of thyroid stimulation and thyroid hormone action.
Hrsg.: A. v. z. Mühlen u. H. Schleusener, Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

36. NUTT, J., K. HUMPHREYS, F. CLARK
A modified bioassay for thyroid-stimulating hormone and long-acting thyroid stimulator
J. Endocr. 63, 5 (1974)

37. O'DONNELL, J., K. TROKOUDES, J. SILVERBERG, V. ROW, R. VOLPÈ
Thyrotropin displacement activity of serum immunoglobulins from patients with Graves' disease
J. Clin. Endocrinol. Metab. 46, 770 (1978)

38. ONAYA, T., M. KOTANI, T. T. YAMADA, Y. OCHI
New in vitro tests to detect the thyroid stimulator in sera from hyperthyroid patients by measuring colloid droplet formation and cyclic AMP in human thyroid slices
J. Clin. Endocrinol Metab. 36, 859 (1973)

39. ORGIAZZI, J., D. E. WILLIAMS, I. J. CHOPRA, D. H.SOLOMON
Human thyroid adenyl cyclase stimulator in immunoglobulin G of patients with Graves' disease. In: Thyroid Research. Hersg.: J.Robbins und L. E. Braverman, Excerpta Medica, Amsterdam (1976)

40. PETERSEN, V. B., P. J. DAWES, B. R. SMITH, R. HALL
Solubilization and partial characterization of the human thyrotropin receptor
Biochem. Soc. Transactions 5, 1399 (1978)

41. RAPOPORT, B., R. J. PILLARISETTY, E. A. HERMAUX, O. H. CLARK, E. G. CONGCO
Production of a non-immunoglobulin thyroid stimulator by human lymphocytes during mixed culture with human thyroid cells
J. Biol. Chem. 253, 631 (1978)

42. SCATCHARD, G.
The attraction of proteins for small molecules and ions
Ann. N. Y. Acad. Sciences 51, 6601 (1949)

43. SCHLEUSENER, H., R. FINKE, P. KOTULLA, K. W. WENZEL, H. MEINHOLD, H. D. RÖDLER
Determination of thyroid stimulating immunoglobulins (TSI) during the course of Graves' disease. A reliable indicator for remission and persistance of the disease?
Endocr. Invest. 2, 155 (1978)

44. SCHLEUSENER, H., P. KOTULLA, F. ADLKOFER, R. FINKE
Wirkungsmechanismus und Bedeutung von schilddrüsenstimulierenden Antikörpern bei der Entstehung der Hyperthyreose vom Typ Basedow
In: Schilddrüse 1975. Hrsg.: J. Herrmann, H. L. Krüskemper und B. Weinheimer, Thieme Verlag, Stuttgart (1977)

45. SCHLEUSENER, H., P. KOTULLA, F. ADLKOFER, S. S. NUSSEY, S. Q. MEHDI
Clinical application of a radioreceptor assay for thyroid stimulators
Horm. Metab. Res. 7, 360 (1975)

46. SCHLEUSENER, H., P. KOTULLA, I. KRUCK, G. KRUCK, D. GEISSLER, F. ADLKOFER
Comparison and evaluation of the radio-ligand receptor assay and the mouse bioassay for the detection of human thyroid stimulating immunoglobulins
In: Thyroid Research. Hrsg.: J. Robbins, L. E. Braverman, Excerpta Medica, Amsterdam (1976)

47. SHISHIBA, V., T. SHIMIZU, S. YOSHIMURA, K. SHIZUME
Direct evidence for human thyroidal stimulation by LATS protector
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 517 (1973)

48. SMITH, B. R.
Immunology of the thyrotropin receptor
Immunol. Com. 5, 345 (1976)

49. SMITH, B. R., K. J. DORRINGTON, D. S. MUNRO
The thyroid stimulating properties of long-acting thyroid-stimulator G globulin subunits
Biochim. Biophys. Acta 192, 277 (1969)

50. SMITH, B. R., R. HALL
Binding of thyroid stimulators to thyroid membranes
FEBS lett. 42, 301 (1974)

51. SMITH, B. R., R. HALL
Thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' disease
Lancet 2, 427 (1974)

52. SMITH, B. R., G. A. PYLE, V. B. PETERSEN, R. HALL
Interactions of thyroid-stimulating antibodies with the human thyrotropin receptor
J. Endocr. 75, 401 (1977)

53. TATE, R. L., M. HOLMES, L. D. KOHN, R. J. WINAND
Characteristics of a solubilized thyrotropin receptor from bovine plasma membranes
J. Biol. Chem. 250, 6527 (1975)

54. TATE, R. L., H. J. SCHWARTZ, J. M. HOLMES, L. D. KOHN
Thyrotropin receptors in thyroid plasma membranes
J. Biol. Chem. 250, 6509 (1975)

55. TATE, R. L., R. J. WINAND, L. D. KOHN
Solubilization and partial purification of the thyrotropin receptor
In: Thyroid Research. Hrsg.: J. Robbins, L. E. Braverman, Excerpta Medica, Amsterdam (1976)

56. VERRIER, B., G. FAYET, S. LISSITZKY
Thyrotropin-binding properties of isolated thyroid cells and their purified plasma membranes
Eur. J. Biochem. 42, 355 (1974)

57. VOLPÉ, R., N. R. FARID, C. V. WETARP, V. V. ROW
The pathogenesis of Graves' disease and Hashimoto thyroiditis
Clin. Endocrinol. 3, 239 (1974)

58. WINAND, R. J., L. D. KOHN
Thyrotropin effects on thyroid cells in culture
J. Biol. Chem. 250, 6534 (1975)

59. WINAND, R. J., P. A. WADELEUX, J. ETIENNE-DECERF, L. D. KOHN
Biochemical basis of thyroid stimulation in using thyroid cells in tissue culture
In: Biochemical basis of thyroid stimulation and thyroid hormone action. Hrsg.: A. v.z.Mühlen u. H. Schleusener, Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

60. WOLFF, J., A. B. JONES
The purification of bovine thyroid plasma membranes and the properties of membrane-bound cyclase
J. Biol. Chem. 246, 3939 (1971)

LEBENSLAUF

Am 13. 7. 1954 wurde ich als Tochter des Dipl.Ing. Wilhelm Eissfeldt und seiner Ehefrau Thilde, geb.Schindler, in München geboren.
Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule und wechselte anschließend auf das neusprachliche Gymnasium Max-Joseph-Stift in München, wo ich 1973 die Reifeprüfung ablegte.
Im selben Jahr begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Medizinstudium, das ich im Frühjahr 1980 mit dem dritten Teil des Staatsexamens beendete.

Die Promotionsarbeit begann ich im Februar 1977.

Seit Juli 1980 bin ich mit dem Dipl. Ing. Klaus Wille verheiratet.